

明 細 書

蛋白質のアミロイド性の構造変化を検出する方法、アミロイド性の構造変化に影響を与える活性を有する物質を探索する方法、アミロイド関連疾患の治療薬又は診断薬を探索する方法

技術分野

[0001] 本発明は、メカノケミカル式センサーを用いて蛋白質のアミロイド性の構造変化を検出する方法に関する。更に本発明は、メカノケミカル式センサーを用いて蛋白質のアミロイド性の構造変化を検出することにより、アミロイド性の構造変化に影響を与える活性を有する物質を探索する方法、ならびにアミロイド関連疾患の治療薬または診断薬を探索する方法に関する。

背景技術

[0002] アルツハイマー病や免疫細胞性アミロイドーシス、反応性アミロイドーシス、家族性アミロイドーシスなどを含むアミロイド関連疾患は、蛋白質の誤った折りたたみ構造に起因する疾患である。アルツハイマー病の進行を一時的に遅らせる薬剤はあるが、これらのアミロイド関連の疾患は難治性であることが多い。現在ヒトにおいて、約20の蛋白質が誤った折りたたみ構造からアミロイド線維を形成することが知られているが、それらの約20の蛋白質は互いに相同性を有しない蛋白質である。

[0003] 上記の構造を有するアミロイドは繊維状蛋白質であり、アミロイド繊維はある病的な条件下で血管や他の組織に枕積することにより機能障害を引き起こす。アミロイド繊維は、数千の非共有結合で結合した蛋白質あるいはペプチドから構成される、層状の β シート構造を有している。このアミロイド性の構造変化を阻害することで、アミロイド蛋白質の不安定性を増加することにより、疾患を抑制することができる可能性が示唆されている(P. Hammarstromら、Science, 2001, 293, 2459)。以上のように、アミロイド蛋白質の構造変化を検出することは重要であり、アミロイド性の構造変化を抑制する化合物を探索することによりアミロイド関連疾患の治療薬が見つかる可能性がある。

[0004] アミロイド蛋白質の凝集の活性評価およびスクリーニングは、従来から濁度の測定(J. Jarrettら、Biochemistry, 1993, 32, 4693)、チオフラビンT結合部位の測定(H.

Naikiら、Lab. Invest., 1991, 65, 104、H. LeVine, Protein Sci., 1993, 2, 404)、コンゴレッド染色(E. M. Castanoら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 1986, 141, 782)、蛍光法(T.H.J. Huang ら、J. Mol. Biol., 1997, 269, 214)、ラマンスペクトルによる散乱光の測定(T. Miuraら、Biochemistry, 2000, 39, 7024)、NMRあるいは電子顕微鏡での観察法(X. Wuら、第224回ACS National meeting and Exposition, 2002、C. Sotoら、J. Biol.Chem., 1995, 270, 3063)などの手段により行われてきた。

[0005] これらの方法においては、通常数時間から一週間ほどかけて蛋白質の凝集を作製して検出しているので、評価に時間がかかるという問題がある。従って、短時間でアミロイド蛋白質の凝集を検出できるセンサーを用いれば、活性を効率的に評価することができる。

[0006] またこれらの方法は、凝集した結果を観察および測定するという手法であるために、凝集の過程を、張力及び／又は弾性の変化を指標として力センサーなどを用いてリアルタイムに測定可能な手段はない。

発明の開示

[0007] そこで本発明の課題は、力センサーを用いて、アミロイド蛋白質の凝集の過程を張力及び／又は弾性の変化としてリアルタイムに検出測定するための手段を提供することである。それによってアミロイド蛋白質の凝集に伴う構造変化を、簡便かつ短時間で検出することが可能となる。

[0008] 本発明者らは、アミロイド蛋白質からなる試料膜に披検物質を添加したときに生じるアミロイド性の構造変化を、試料膜の張力及び／又は弾性変化により検出できることを見出すことにより本発明を完成するに至った。本発明の方法は、多数の物質の中から、効率よくアミロイド蛋白質の構造変化に影響を与える活性をもつ物質を探索するのに有効であると考えられる。

[0009] よって本発明は、アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質、前記蛋白質の断片、前記蛋白質の変異体、タグ化した前記蛋白質、又は前記蛋白質に対する抗体蛋白質よりなる試料膜を基板上に形成し、当該試料膜を有する当該基板を力センサーに配置し、披検サンプルを当該試料膜に作用させた際の当該試料膜の張力及び／又は弾性の変化を当該力センサーにより検出することからなる、蛋白質のアミロイド性の構

造変化を検出する方法を提供するものである。

[0010] 更に本発明は、アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質、前記蛋白質の断片、前記蛋白質の変異体、タグ化した前記蛋白質、又は前記蛋白質に対する抗体蛋白質よりなる試料膜を基板上に形成し、当該試料膜を有する当該基板を力センサーに配置し、披検サンプルを当該試料膜に作用させた際の当該試料膜の張力及び／又は弾性の変化を当該力センサーにより検出することからなる、アミロイド性の構造変化に影響を与える活性を有する物質を探索する方法を提供するものである。

[0011] 更に本発明は、アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質、前記蛋白質の断片、前記蛋白質の変異体、タグ化した前記蛋白質、又は前記蛋白質に対する抗体蛋白質よりなる試料膜を基板上に形成し、当該試料膜を有する当該基板を力センサーに配置し、披検サンプルを当該試料膜に作用させた際の当該試料膜の張力及び／又は弾性の変化を当該力センサーにより検出することからなる、アミロイド関連疾患の治療薬又は診断薬を探索する方法を提供するものである。

[0012] 本発明により、メカノケミカル式センサーを用いて蛋白質のアミロイド性の構造変化を検出する方法、当該方法を用いてアミロイド関連疾患の治療薬または診断薬をスクリーニングする方法、ならびにアミロイド性の構造変化に影響を与える活性を有する物質を探索する方法が提供された。本発明の方法は、新規なアミロイド病の治療薬・診断薬を得る目的に資するものであると考えられる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、アミロイド β (1-42) の張力及び弾性変化に対する ZnCl_2 およびEDTAの効果を示した図である。

[図2]図2は、アミロイド β (1-42) の張力及び弾性変化に対する ZnCl_2 の濃度依存性を示した図である。

[図3]図3は、アミロイド β (1-42) の張力及び弾性変化に対する CuCl_2 およびEDTAの効果を示した図である。

[図4]図4は、 α -シヌクレインの張力および弾性変化に対する ZnCl_2 の濃度依存性を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0014] 従来はアミロイド蛋白質の凝集を作成することによりアミロイド蛋白質の凝集活性を検出していたが、従来の方法は手間と時間を多く必要とするものであった。本発明は力センサーを使用することにより、簡便かつリアルタイムにアミロイド蛋白質の構造変化を検出することを可能としたものである。
- [0015] 本願明細書において、「アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質」とは、特異な層状の β シート構造からなるアミロイド繊維を形成するような構造変化を起こす蛋白質を意味するものであり、かかる蛋白質はアミロイド関連疾患の原因となる。アミロイド性の構造変化を起こすことが知られている蛋白質の例として、これらに限定するものではないが、アミロイド β 蛋白質、免疫グロブリン軽鎖蛋白質、アミロイドA蛋白質、トランスサイレチン蛋白質、リソザイム、BriL蛋白質、シスタチンC蛋白質、スクレイピー蛋白質、 β 2ミクログロブリン、アポリポプロテインA1、ゲルゾリン、ランゲルハンス島アミロイド蛋白質、フィブリノーゲン、プロラクチン、インシュリン、カルシトニン、心房性ナトリウムペプチド、 α -シヌクリン、プリオン蛋白質、ハンチンチン蛋白質、スーパーオキシジスムターゼ、 α 1-アンチキモトリプシ及びタウ蛋白質などを挙げることができる。この中でもアミロイド β 蛋白質は、アミロイド性の構造変化を起こす代表的な蛋白質として良く知られている。
- [0016] そしてかかる蛋白質のアミロイド性の構造変化を、該蛋白質からなる試料膜の機械的特性の変化により検出する点に本発明の最も顕著な特徴がある。本発明において試料膜の機械的特性の変化を、張力のみ、弾力のみあるいは張力と弾力の両者を指標として測定する態様が可能であるが、本発明は上記の特定の態様に限定されるものではない。
- [0017] 本発明においてはまず、アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質からなる試料膜を基板上に形成する。形成される試料膜の大きさは、好ましくは、縦は $50\mu\text{m}$ から $1000\mu\text{m}$ 、横は $200\mu\text{m}$ から $2000\mu\text{m}$ 、厚さは $0.3\mu\text{m}$ から $10\mu\text{m}$ の範囲内であるが、その範囲内に特に限定されるものではない。また本発明における基板とは、その上に試料膜が作製されることによって試料膜を測定装置に移動することを可能とする適切な膜の支持体であり、該基板の材料や大きさは特に限定されるものではない。
- [0018] なおアミロイド性の構造変化を起こす蛋白質のみならず、該蛋白質の断片や変異

体蛋白質も、アミロイド性の構造変化を起こす活性を維持している限り使用することができる。また検出の便宜のために該蛋白質はタグを付した物でも良い。更に該蛋白質に対する抗体蛋白質から膜を形成しても良く、形成した抗体蛋白質からなる膜に該蛋白質を結合させたものを用いても、同様の効果を得ることができる。

[0019] かかる蛋白質の試料膜を作製する方法としては、エレクトロスプレー（静電噴霧）により試料を堆積させて薄膜を形成させるESD法や、溶液を乾燥させることにより膜を形成させる乾燥法などを挙げることができる。かかる技術は当業者にとって周知のものであり、適宜改変して本発明の目的に使用することができる。そのような技術を開示した文献の一例として、特表2002-511792号公報に記載されている、巨大生体分子を含む不揮発性物質の堆積物を、静電噴霧によって製造する方法を挙げることができる。

[0020] また特開2003-136005号公報には、生体高分子などの活性を保持したまま固定して薄膜やスポットを作製するための装置が記載されている。更に特表2002-503332号公報には、プロテインやDNAと結合するリガンドを測定するための方法及び装置が記載されている。特表2002-503332号公報に記載されている装置によると、生体高分子などから構成された試料膜に対する化学物質の作用を機械化学的（メカノケミカル的）に測定することが可能である。よって、特表2002-503332号公報に記載されている装置により、試料膜の張力及び／又は弾性の変化を検出することは、本発明において好ましい態様である。

[0021] なお、蛋白質とリガンドの相互作用を測定するために、蛋白質膜の弾力特性を測定するメカノケミカル的な方法は、V.N,Morozov and T Ya Morozova (1992) Anal.Biochem., 201:68-79及びV.N,Morozov and T Ya Morozova (1984) FEBS Letters, 175:299-302に記載されており、当業者はこれらの文献の記載を参考にして適宜改変を行い、本発明を実施することができる。

[0022] また上記基板と試料膜との間に水溶性ポリマーからなる中間層を設けることは本発明において好ましい態様である。下記の実施例においては1.2%ポリビニルピロリドン（PVP）をこのような中間層として用いている。かかる中間層を設けることにより、基板から試料膜を取り外すことが容易となる。中間層としてPVPを用いる場合には、PVPの濃

度は0.1%から5%、好ましくは0.3%から2%の範囲内であるが、PVPの濃度は特に限定されるものではない。また、他の水溶性ポリマーを使用することも可能である。

- [0023] なおこの中間層として使用することができる材料の例として、特表2002-503332号公報に記載されているように、(1)ポリアクリルアミド又はポリエチレングリコールのような水溶性のポリマーの層、(2)メルカプトエタノールにより還元される二硫化物のボンドを有するポリマーから成る層、(3)堆積される生物学的分子に対する接着性が低く、炭素を相当に分散させた層、および(4)低融点のカーボンポリマーの導電性の組成の層、を挙げることができる。
- [0024] その後上記試料膜を構成する蛋白質を架橋することにより該蛋白質を固定化することができ、かかる架橋を行うことは試料膜の膜としての形態や強度を保つ目的においても有効である。生物学的分子を重合するために利用できる架橋試薬は当業者に良く知られており、例えば、Hermanson et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques Academic Press, New York, 1991を参照することができる。
- [0025] 蛋白質を架橋するために使用する試薬としては、下記の実施例で使用しているグルタルアルデヒドは最も好適である。その他に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)ピロピルカルボジイミド(EDC)などのゼロ長架橋試薬、ジメチルアジピンイミデート(DMA)などのホモ二価性架橋試薬、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)などのヘテロ二価性架橋試薬、4-アジド-2-ニトロフェニルビオシチン-4-ニトロフェニルエステルなどの三価性架橋試薬を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。また架橋反応を行う時間も特に限定されるものではなく、下記の実施例のグルタルアルデヒドの架橋時間は5分間であるが、0から3時間程度の範囲内で最適の条件を適宜選択することができる。
- [0026] その様にして作製した試料膜を、例えば特表2002-503332号公報記載の検出装置に配置し、適切な緩衝液中に浸すことにより、試料膜に披験サンプルを作用させる準備を行う。ここで使用する緩衝液としては、本技術分野で一般的に使用されているHepes緩衝液やTris緩衝液などを使用することができるが、それらに限定されるものではない。緩衝液のpHも特に限定されるものではなく、pH3からpH9程度の範囲内で適切なpHを適宜選択することができる。

- [0027] また上記緩衝液は適切な塩強度を有することも可能であり、下記の実施例のように0.15M程度の塩化ナトリウムを緩衝液に添加することは本発明において好ましい態様である。しかし塩強度を与えるための電解質を添加しないで測定を行うことも可能であると考えられ、かかる態様も本発明の範囲内である。また添加する電解質も塩化ナトリウムに限定されるものではない。
- [0028] 上記の緩衝液を一定流速で流して試料膜の張力を安定化させた後に、試験を行う対象である披験サンプルを含む緩衝液に置換して試料膜に作用させる。披験サンプル添加前と後における試料膜の張力及び／又は弾性変化を力センサーにより測定し、アミロイド蛋白質の構造変化への影響を評価する。張力及び／又は弾性の変化は力センサーにより、好ましくはメカノケミカル式センサーにより測定することが可能である。なおメカノケミカル式センサーによる測定を、特表2002-503332号公報に記載されている装置を用いて行うことは、本発明において特に好ましい態様である。
- [0029] なお蛋白質のアミロイド性の構造変化に対する影響を検討するための披験サンプルとして、種々の物質を採用することができる。その様な披験サンプルとなる物質の例として、蛋白質、ペプチド、アミノ酸、糖、脂質、核酸、金属及び有機化合物などを挙げることができるが、それらに特に限定されるものではない。
- [0030] 本発明の方法により、アミロイド蛋白質の張力及び／又は弾性変化を、速やかに且つリアルタイムで検出することができる。よって、多くのサンプルにおけるアミロイド性の構造変化を効率的に評価できるために、アミロイド性の構造変化を阻害する物質の探索に費やす時間を大幅に短縮することができ、容易に多数の物質の中からかかる活性を有する物質を選別することができる。またアミロイド性の構造変化を阻害する物質は、アミロイド病に対する治療薬又は診断薬の良い候補と成り得る。具体的には、アミロイド性の構造変化を阻害する物質が得られたならば、更に安全性の検討などを行い、新規なアミロイド病に対する治療薬を開発することが可能であると考えられる。

実施例

- [0031] 下記の実施例や図面を用いて本発明を更に詳しく説明するが、その記載は本発明の範囲を何ら限定するものではない。

[0032] 実施例1: アミロイド β の張力及び弾性変化に対する ZnCl_2 の効果

アミロイド β (1-42) (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) を0.1%アンモニア水に1 mg/mLの濃度で溶解し、その溶液を特表2002-511792号公報に記載された静電噴霧を行う装置、あるいは特開2003-136005号公報に記載された固定化装置を用いて乾燥空气中で噴霧し、縦400 μm 横800 μm の孔をもつマスクを透過させ、静電噴霧法(ESD法)により厚さ1 μm の膜を1.2%ポリビニルピロリドン上に作成し、グルタルアルデヒドで蛋白質の架橋を行った。

[0033] この膜を、メカノケミカル式センサーを有する特表2002-503332号公報あるいは米国特許US6033913号公報に記載されている装置上に配置し、0.15 M NaClを含む10 mM Hepes pH7.4緩衝液(以下、緩衝液と略す)中に浸した。緩衝液を、検出装置上に存在する膜上に0.1から0.2 mL/minの流速で流し、張力を安定させた。その後、同じ流速で、上記緩衝液中に溶解した ZnCl_2 溶液を流し、張力および弾性の変化を検出した(図1)。図1のグラフにおける変動は、 ZnCl_2 によりアミロイド β (1-42)の膜の等方性張力とコンプライアンス(剛性の逆数)が著しく増加することを示している。

[0034] 一方、キレーターであるEDTAにより ZnCl_2 溶液添加前の状態に戻ることから、 ZnCl_2 の作用は可逆的であると考えられる。図1において一様な状態、即ち水平線が立ち上がるところは、試料膜に張力が加わった時点を示し、振動している箇所においてコンプライアンスの検出を行なっている。図1の結果は、本発明により、アミロイド β (1-42)と ZnCl_2 との特別な相互作用を数分で検出できることを示したものである。ここにおける特別な相互作用とは、X. Huangら(J. Biol. Chem., 1997, 272, 26464)、C.S. Atwoodら(J. Biol. Chem., 1998, 273, 12817)あるいはR.A. Chernyら(Neuron, 2001, 30, 665)など多数の報告と考え合わせると、 Zn^{2+} が引き起こすアミロイド β (1-42)の凝集と考えられる。

[0035] 更に ZnCl_2 の濃度を0.01mMから3mMまで変えて測定することにより、 ZnCl_2 の濃度の影響を検討した(図2)。その結果図2に示されるように、 ZnCl_2 溶液に応じた弾性の変化の大きさは、濃度依存的である。

[0036] 実施例2: アミロイド β の張力及び弾性変化に対する CuCl_2 の効果

アミロイド β (1-42)の膜を、実施例1に記載したように調製し、同様に検出装置上

に配置し、緩衝液に溶解した CuCl_2 の張力および弾性の変化を検討した(図3)。実施例1と同様に、 CuCl_2 においても、濃度依存的な張力および弾性の変化が認められ、EDTAにより張力は添加前の状態にほぼ回復した。 Zn^{2+} と同様に、 Cu^{2+} においても、アミロイド β の凝集を容易にすることが報告されている。その様な知見は、本法において検出されている現象がアミロイド β の凝集であることを補強するものである。

[0037] 実施例3: α -シヌクレインの張力および弾性変化に対する ZnCl_2 の効果

α -シヌクレイン(BIOMOL International LP, PA, USA)の膜を実施例1に記載したように作製し、検出装置上に配置した。緩衝液に溶解した ZnCl_2 の張力および弾性の変化を検討した(図4)。その結果、実施例1と同様に、 α -シヌクレインにおいても、 ZnCl_2 による濃度依存的な張力および弾性の変化が認められた。なおEDTAにより張力は添加前の状態にほぼ回復した。

産業上の利用可能性

[0038] 本発明により、メカノケミカル式センサーを用いて蛋白質のアミロイド性の構造変化を検出する方法が提供された。更に上記検出方法を用いてアミロイド性の構造変化に影響を与える活性を有する物質を探索する方法、ならびにアミロイド関連疾患の治療薬または診断薬を探索する方法が提供された。本発明の方法は、新規なアミロイド病の治療薬・診断薬を得る目的に資するものであると考えられる。

請求の範囲

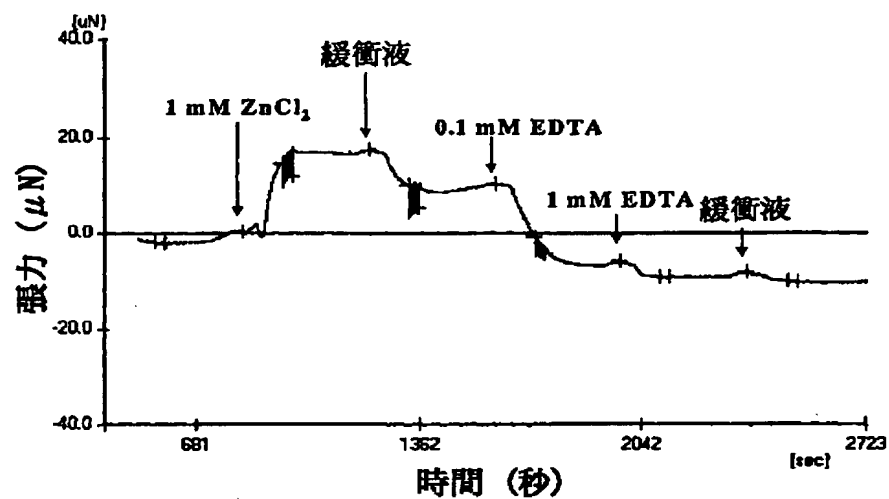
- [1] アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質、前記蛋白質の断片、前記蛋白質の変異体、タグ化した前記蛋白質、又は前記蛋白質に対する抗体蛋白質よりなる試料膜を基板上に形成し、当該試料膜を有する当該基板を力センサーに配置し、被検サンプルを当該試料膜に作用させた際の当該試料膜の張力及び／又は弾性の変化を当該力センサーにより検出することからなる、蛋白質のアミロイド性の構造変化を検出する方法。
- [2] 前記力センサーが、メカノケミカル式センサーである、請求項1記載の方法。
- [3] 前記アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質が、アミロイドβ蛋白質、免疫グロブリン軽鎖蛋白質、アミロイドA蛋白質、トランスサイレチン蛋白質、リソザイム、BriL蛋白質、シスタチンC蛋白質、スクレイピー蛋白質、β2ミクログロブリン、アポリポプロテインA1、ゲルゾリン、ランゲルハンス島アミロイド蛋白質、フィブリノーゲン、プロラクチン、インシュリン、カルシトニン、心房性ナトリウムペプチド、α-シヌクリン、プリオン蛋白質、ハンチンチン蛋白質、スーパーオキシドジスムターゼ、α1-アンチキモトリプシン及びタウ蛋白質からなる群から選択された蛋白質である、請求項1記載の方法。
- [4] 前記アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質がアミロイドβ蛋白質である、請求項3記載の方法。
- [5] アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質、前記蛋白質の断片、前記蛋白質の変異体、タグ化した前記蛋白質、又は前記蛋白質に対する抗体蛋白質よりなる試料膜を基板上に形成し、当該試料膜を有する当該基板を力センサーに配置し、被検サンプルを当該試料膜に作用させた際の当該試料膜の張力及び／又は弾性の変化を当該力センサーにより検出することからなる、アミロイド性の構造変化に影響を与える活性を有する物質を探索する方法。
- [6] 前記力センサーが、メカノケミカル式センサーである、請求項5記載の方法。
- [7] 前記アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質が、アミロイドβ蛋白質、免疫グロブリン軽鎖蛋白質、アミロイドA蛋白質、トランスサイレチン蛋白質、リソザイム、BriL蛋白質、シスタチンC蛋白質、スクレイピー蛋白質、β2ミクログロブリン、アポリポプロテインA1、ゲルゾリン、ランゲルハンス島アミロイド蛋白質、フィブリノーゲン、プロラクチン

、インシュリン、カルシトニン、心房性ナトリウムペプチド、 α -シヌクリン、プリオン蛋白質、ハンチンチン蛋白質、スーパーオキシドジスムターゼ、 α 1-アンチキモトリプシン及びタウ蛋白質からなる群から選択された蛋白質である、請求項5記載の方法。

- [8] 前記アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質がアミロイド β 蛋白質である、請求項7記載の方法。
- [9] アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質、前記蛋白質の断片、前記蛋白質の変異体、タグ化した前記蛋白質、又は前記蛋白質に対する抗体蛋白質よりなる試料膜を基板上に形成し、当該試料膜を有する当該基板を力センサーに配置し、披検サンプルを当該試料膜に作用させた際の当該試料膜の張力及び／又は弾性の変化を当該力センサーにより検出することからなる、アミロイド関連疾患の治療薬又は診断薬を探索する方法。
- [10] 前記力センサーが、メカノケミカル式センサーである、請求項9記載の方法。
- [11] 前記アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質が、アミロイド β 蛋白質、免疫グロブリン軽鎖蛋白質、アミロイドA蛋白質、トランスサイレチン蛋白質、リソザイム、BriL蛋白質、シスタチンC蛋白質、スクレイピー蛋白質、 β 2ミクログロブリン、アポリポプロテインA1、ゲルゾリン、ランゲルハンス島アミロイド蛋白質、フィブリノーゲン、プロラクチン、インシュリン、カルシトニン、心房性ナトリウムペプチド、 α -シヌクリン、プリオン蛋白質、ハンチンチン蛋白質、スーパーオキシドジスムターゼ、 α 1-アンチキモトリプシン及びタウ蛋白質からなる群から選択された蛋白質である、請求項9記載の方法。
- [12] 前記アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質がアミロイド β 蛋白質である、請求項11記載の方法。
- [13] アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質からなる試料膜。
- [14] 前記アミロイド性の構造変化を起こす蛋白質がアミロイド β 蛋白質である、請求項13記載の試料膜。
- [15] 静電噴霧法によりアミロイド β 蛋白質を堆積させることにより形成された、請求項14記載の試料膜。

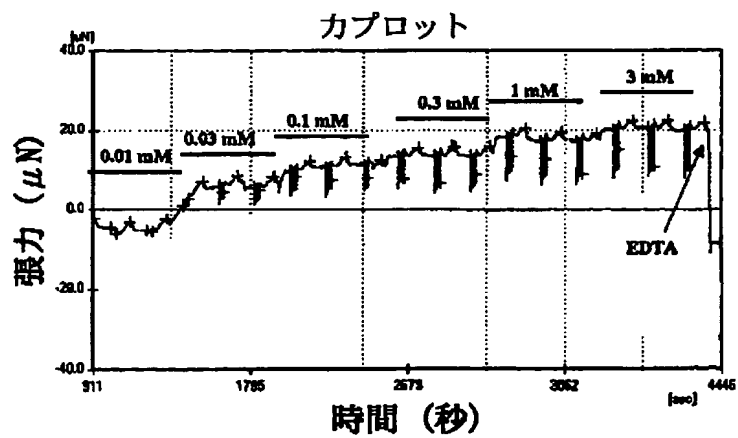
[図1]

FIG. 1

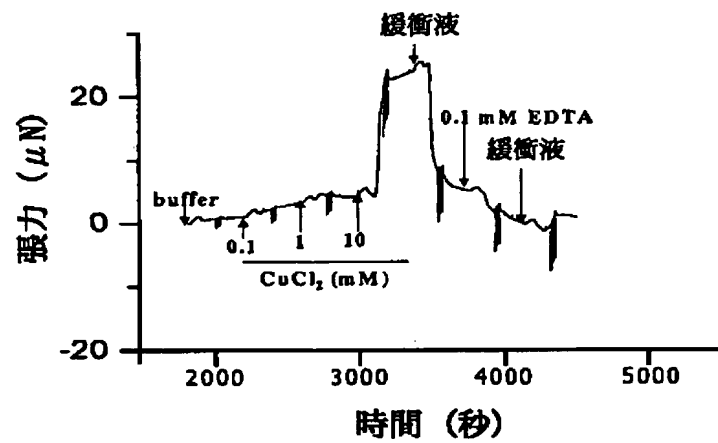


[図2]

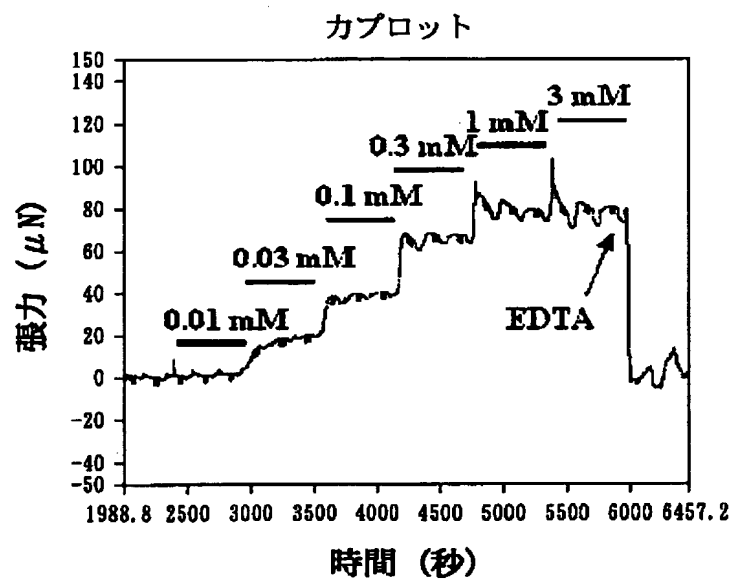
FIG. 2



[図3]

FIG. 3

[図4]

FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/68, C12M1/40, C12Q1/26, G01N3/00, 33/15, 33/50, 33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/68, C12M1/40, C12Q1/26, G01N3/00, 33/15, 33/50, 33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JMEDPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOGAMI "Mechanochemical Sensor", Materials Science and Technology, Vol.41, No.1, 20 February, 2004 (20.02.04), pages 6 to 10	1-15
Y	WO 2002/097444 A (ARETE ASSOC), 05 December, 2002 (05.12.02), All pages & US 2003/104633 A & EP 1395833 A & JP 2004-536296 A	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 June, 2005 (09.06.05)

Date of mailing of the international search report

28 June, 2005 (28.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/68, C12M1/40, C12Q1/26, G01N3/00, 33/15, 33/50, 33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/68, C12M1/40, C12Q1/26, G01N3/00, 33/15, 33/50, 33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JMEDPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	最上「メカノケミカルセンサー」 材料の科学と工学 Vol. 41, No. 1 (2004年2月20日) 第6-10頁	1-15
Y	WO 2002/097444 A (ARETE ASSOC) 2002.12.05, 全頁 & US 2003/104633 A & EP 1395833 A & JP 2004-536296 A	1-15

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.06.2005

国際調査報告の発送日

28.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2J

9217